



克拉玛依油田石油污染土壤细菌群落结构与环境因子的关系

梁建芳¹, 杨江科², 杨杨¹, 晁群芳^{1*}, 殷亚兰¹, 赵亚光¹

¹ 新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046

² 武汉轻工大学生物工程与制药学院, 湖北 武汉 430023

摘要: 【目的】以16S rRNA为分子标记, 探讨克拉玛依油田石油污染土壤中细菌群落多样性和系统发育, 并分析环境因子对群落分布的影响, 为生物降解石油污染物提供理论基础。【方法】在克拉玛依油田分别采集深度为5、20、50 cm的石油污染土壤样品, 测定环境参数; 提取石油污染土壤细菌群落基因组DNA, 分别构建3个土层细菌16S rRNA基因文库, 利用限制性片段长度多态性分析(Restriction fragment length polymorphisms RFLP)技术初步分群, 确定各文库中的代表菌株并测定16S rRNA基因序列; 利用软件Biodap计算各群落多样性和丰富度指数, 以Neighbor-Joining法构建3个土层细菌的系统发育树; 运用软件CANOCO 4.5结合不同样品环境因子的差异进行典型对应分析(CCA), 并探讨了环境因子对细菌多样性的影响。【结果】环境参数结果表明20 cm土层总磷(TP)、总氮(TN)含量最低, 50 cm含量最高; 5 cm土层中有机碳(TOC)含量最高, 50 cm含量最低。基于16S rRNA序列的生物多样性和物种丰富度指数表明20 cm土层生物多样性和丰富度指数较高, 而50 cm土层各项指数均较低。各土层供试序列RFLP聚类分析表明, 克拉玛依油田石油污染土壤细菌种群具有丰富的多样性。Neighbor-Joining构建的系统发育分析表明, 石油污染土壤被分为5个类群(I-V), 分别为变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicute)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、浮霉状菌门(Planctomycetes), 其中群 I 占78.57%, 广泛分布于不同的生态环境; 其中来自5 cm土层代表菌的69.23%分布于群 I。CCA分析结果显示TN、TP和TOC对大部分细菌影响较大; TOC含量对*Pseudomonas*影响明显。【结论】克拉玛依油田石油污染土壤细菌群落具有丰富的多样性; 环境因子是影响石油污染土壤细菌群落空间分布的重要因素。

关键词: 石油污染土壤, RFLP分析, 细菌多样性, 系统发育分析, CCA分析

准噶尔盆地油气资源十分丰富, 克拉玛依油田位于其西北边缘, 该油田是新中国成立后开发建设的第一个大油田, 原油产量居中国陆上油田第四位。在该地区石油产业的发展过程中, 由于

基金项目: 国家自然科学基金(31460027)

*通信作者。E-mail: xjchqf@sina.com

收稿日期: 2015-11-08; 修回日期: 2016-01-11; 网络出版日期: 2016-01-22

开采和运输过程存在一些不合理的作业方式,导致大量石油污染物排放到土壤环境中,造成土壤石油污染严重化^[1]。土壤环境遭受污染,直接危害到人类生产活动。石油污染已经成为该地区土壤生态环境的一个重要突出问题。石油污染物可以影响土壤的理化性质,导致微生物群落多样性及其群落结构发生改变。

以往对微生物的研究主要基于传统的分离培养,但在环境样品中大部分微生物属于不可培养,在很大程度上难以客观评价微生物多样性。现代分子生物技术克服了纯培养法的不足之处,可以从基因水平估计物种多样性和丰富度,分析种的变异,可以较准确地了解环境中微生物的群落组成。基于16S rRNA的分子标记技术,分析微生物多样性已成为微生物生态学研究的重要方法之一^[2]。

近年来对石油污染土壤微生物的研究主要基于石油烃降解菌的筛选和构建^[3-5]。在克拉玛依油田石油污染土壤微生物方面,本实验室尹丹丹等^[6]研究了该油田内源微生物的激活条件;王旭辉等^[7]从该区域筛选高效石油降解菌;陈志丹等^[8]和杨滨银等^[9]分别从该地区筛选出降解多环芳烃萘和菲的细菌;曹小妮^[10]采用DGGE法研究了该地区的微生物多样性。本研究基于RFLP指纹图谱聚类以及16S rRNA系统发育法,分析该地区石油污染土壤细菌群落垂直分布特征,旨在为石油污染土壤生物修复提供可靠的理论基础。环境因子是影响微生物种群分布的重要因素,本研究利用软件CANOCO 4.5,结合环境因子和微生物种群进行典型对应分析(CCA),探讨两者之间的关系。

由于单一的生物修复期限比较长,为了提高石油降解菌的降解能力,利用现代分子生物学技术构建高效降解石油污染物工程菌株迫在眉睫。为了获得生态适应性强的新型重组菌,本研究为工程菌株的构建提供更多的宿主选择,使工程菌株受土著微生物的影响降到最低。通过基

因工程菌株或获得新型的基因工程菌可以显著提高污染物的降解效率,并为解决生物修复周期相对较长等问题提供了崭新的途径。

1 材料和方法

1.1 样品采集和环境参数测定

克拉玛依油田(84°42'E, 45°36'N)位于克拉玛依市,地处准葛尔盆地西北边缘,夏季最高气温达零上46℃,冬季最低气温达零下42℃。2014年10月中旬,本实验室以克拉玛依油田石油污染的5、20、50 cm 3层土壤中心为基点,采用5点取样法采集各土层土壤。土壤样品运回实验室并保存在4℃冰箱。总氮、总磷、pH值、有机碳参照《土壤农化分析实验指导书》^[11]。

1.2 主要仪器和试剂

Taq DNA 聚合酶、dNTPs、PMD18-T simple Kit、限制性内切酶Hae III购自TaKaRa公司;质粒小提试剂盒购自于北京索莱宝公司;Power Soil DNA Isolation Kit购自MO BIO Laboratories公司;Gel Extraction Kit购自Omega公司;其他试剂均为国产分析纯。PCR仪为Eppendorf 5333型(Hamburg, Eppendorf);凝胶成像系统为Gel logic 200型(Eastman Kodak Company, USA)。

1.3 石油污染土壤细菌总DNA的提取、16S rRNA基因的PCR扩增及克隆文库的构建

称量0.5 g石油污染土壤,提取土壤细菌总DNA。方法参照Power Soil DNA Isolation Kit使用说明。16S rRNA 基因片段(约1500 bp) PCR扩增的引物为27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3'), 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'), PCR反应程序参照张静静等^[12]的描述。扩增产物使用胶回收试剂盒(Gel Extraction Kit)回收,回收产物克隆到PMD18-T simple 载体,转化到大肠杆菌DH5 α 感受态细胞。采用氨苄青霉素抗性筛选阳性克隆子,构建克隆文库。

1.4 16S rRNA基因限制性片段长度多态性分析

从5、20、50 cm 3个土层的16S rRNA基因克隆文库中分别随机挑选80个左右克隆子, 分别提取各克隆子的质粒DNA, 并用限制性内切酶*Hae* III单酶切质粒DNA。并取40 μ L酶切产物于1.8%琼脂糖凝胶中电泳1.5 h, 并通过凝胶成像系统(Gel logic 200)捕获指纹图谱。在NTSYS 2.10软件的辅助下, 采用最简单匹配法, 将酶切图谱转化成数值矩阵, 采用UPGMA法获得酶切图谱的聚类树状图^[13]。基于聚类分析的结果, 从各个文库选择代表性的克隆子, 送至武汉金开瑞生物科技有限公司对16S rRNA 基因片段进行序列分析。

1.5 16S rRNA系统发育分析

在MEGA 6.06软件的辅助下, 测试菌株与参比菌株的16S rRNA序列通过Cluster W程序进行聚类分析, 得到各序列的相似性矩阵, 再以Neighbor-Joining法构建系统发育树, 并在发育树中标出Bootstrap值($n=1000$)>50%的分支。根据聚类分析的结果将克隆子分为不同的分类操作单元(OTU)。

1.6 序列登录号的获取

本次研究所得到的登录号: KT353550-KT353563, KT893461-KT893475。

1.7 去趋势对应分析(DCA)和典型对应分析(CCA)

基于16S rRNA系统发育分析, 将得到的细菌种类以及数量进行物种之间的去趋势对应分析(DCA), 将不同物种进行分组和排序, 以计算其第一排序轴的梯度范围(Lengths of gradient)。不同土层细菌种类结合环境因子的差异性, 使用软件CANOCO 4.5进行典型对应(CCA)分析^[14]。

2 结果和分析

2.1 样品环境参数理化结果及PCA分析

2.1.1 样品环境参数理化结果: 采自克拉玛依油田石油污染的3层土壤样品的环境参数结果见表1。如表1所示, 其中20 cm土壤中TN和TP都低于其它2个土层, 而50 cm土层中这2个元素含量最高。5 cm样品中TOC含量达到48.39 mg/g, 呈重度污染土壤。3层土壤PH值变化范围不大。

2.1.2 环境因子之间的PCA分析: 利用SPSS 21软件对采样点的环境因子进行主成分分析结果如图1。由图1可知, 第一主成分和第二主成分的方差贡献率分别为53.173%和46.827%, 累计贡献率为100% (>80%), PC1和PC2的特征根分别为2.429和1.571。如图1所示TN和TP呈显著正相关, 它们在第一主成分轴上有较大的载荷, 第一主成分主要反应的是TN和TP两个指标; TOC和TOC/TN在第二主成分轴上具有较高的载荷, 第二主成分主要反应的是TOC和TOC/TN含量。

2.2 石油污染土壤细菌16S rRNA基因的RFLP分析

分别以来自克拉玛依油田石油污染的3个土层5、20、50 cm土壤的微生物总DNA为模板, PCR扩增约1500 bp的16S rRNA基因片段, 克隆到pMD18-T载体、转化, 构建3层石油污染土壤的16S rRNA基因克隆文库。从克隆文库中分别挑选80、97、95个克隆子提取质粒DNA, 并用*Hae* III酶切质粒DNA, 通过琼脂糖凝胶电泳获得酶切指纹图谱。16S rRNA基因指纹图谱经UPGMA进行

表1. 采样点环境参数

Table 1. Environmental parameters at the sampling sites

Samples	pH	TN/(mg/g)	TP/(mg/g)	TOC/(mg/g)	TOC/TN
5 cm	8.80 $\pm$ 0.08	0.6528 $\pm$ 0.0200	0.7682 $\pm$ 0.0060	48.39 $\pm$ 0.12	74.13
20 cm	8.82 $\pm$ 0.02	0.3264 $\pm$ 0.1300	0.6525 $\pm$ 0.0080	20.28 $\pm$ 0.92	62.13
50 cm	8.68 $\pm$ 0.04	0.6698 $\pm$ 0.0200	0.7927 $\pm$ 0.0300	2.31 $\pm$ 0.65	3.45

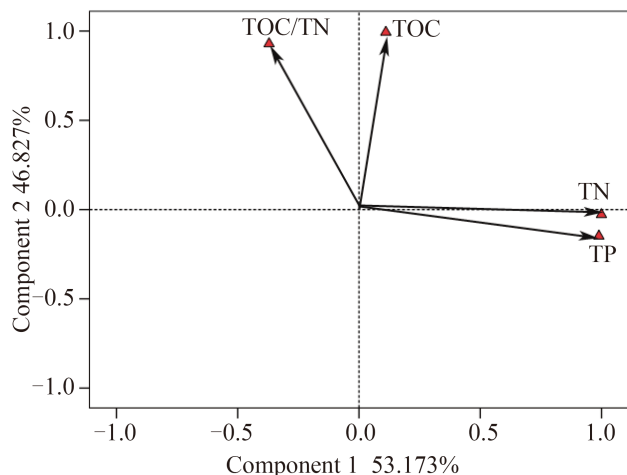


图 1. 环境因子的主成分分析图

Figure 1. PCA ordination graph for the environmental factors.

聚类分析。由图2-A可以看出,在相似性为90%水平,源自5 cm土壤的克隆被分为五大类群,其中55株菌株(占总数的68.75%)集中分布于群 I;在相似性为100%水平,80个克隆子被分为24类。由图2-B可知,在相似性为83%水平,源自20 cm土壤的克隆被分为3大类群,其中45株菌株(占总数46.39%)聚集在群 I;在相似性为100%水平,97个克隆子被分为34类。由图2-C可知,在相似性为83%水平,50 cm土壤的克隆被分为4大类群,其中76株菌株(占总数80%)集中分布在群 I;相似性为100%水平,95个克隆被分为29类。

综合每个土层代表性序列的指纹图谱,利用NTSYS 2.10软件的UPGMA法构建3个土层的综合聚类分析树状图(图3)。如图所示,克拉玛依油田石油污染土壤细菌具有较丰富的多样性。选取的272株菌株被分为6个类群。群 I 最大,包含152个序列,占总数的55.88%;其中源自20 cm土层的菌株占该群总数的42%。其次,为群 VI,该群含有55个克隆,该群菌株主要来自于20 cm和50 cm土层。群IV菌株全部来自于20 cm土层。

2.3 16S rRNA基因系统发育分析

在MEGA 6.06软件辅助下,本研究通过

Neighbor-Joining法构建了基于16S rRNA序列的石油污染土壤细菌系统发育树(图4)。如图4所示,供试菌株在系统发育上明显的分为5个主要的类群(群 I – V)。群 I 包含22个OTUs,占供试总群体的78.57%。该群进一步可分为11个亚群(I A – I J),其中 I -A 含有分别来自3个土层的4个OTUs,该亚群供试菌株16S rRNA序列与来自苏丹铁矿山土壤^[15]以及印度洋西南深海水域^[16]的参比16S rRNA序列具有很高的同源性。亚群 I -B 包含2个OTUS,与来自地中海^[17]以及美国北卡罗来纳大学实验室分离的降解芳香族化合物^[18]的参比序列具有较高的相似性。I -C亚群含有6个来自于5 cm和20 cm土层的OTUs,占总群体的21.43%,它们与来自中国土壤环境^[19]参比序列有97%–99%相似性。I -D亚群有1个来自20 cm土层的OTU,该亚群序列与来自中国国产冰箱分离出来的*Acinetobacter refrigeratorensis*具有较高的相似性^[20]。亚群 I -E和 I -F各含有1个OTU,其分别与来自巴利阿里海环境(*Alteromonas macleodii*)和夏威夷罗希海底火山沉积物参比序列具有较高的同源性^[21]。I -G含有2个OTUs,该亚群与俄罗斯深海^[22]中分离出的*Lysobacter spongiicola*具有一定的同源性。亚群 I -H与*Alcaligenes faecalis* (NR113606)具有99%的同源性。I -I亚群含有3个OTUS,分别与来自于我国土壤环境^[23]、深海沉积物^[24]以及加利福尼亚土壤参比序列具有较高的相似性^[25]。亚群 I -J含有1个OUT,该群与来自德国耐硫酸盐细菌^[26]参比序列具有较高的相似性。Cluster I 中参比菌株在进化分类学上都属于变形菌门(Proteobacteria)。

Cluster II 含有1个OTU,属于放线菌门(Actinobacteria)。Cluster III 有1个OUT,属于厚壁菌门(Firmicute)。Cluster IV 有1个OTU,该群属于拟杆菌门(Bacteroidetes),其与来自于南极地区水中嗜冷细菌^[27]参比序列具有较高的同源性。Cluster V

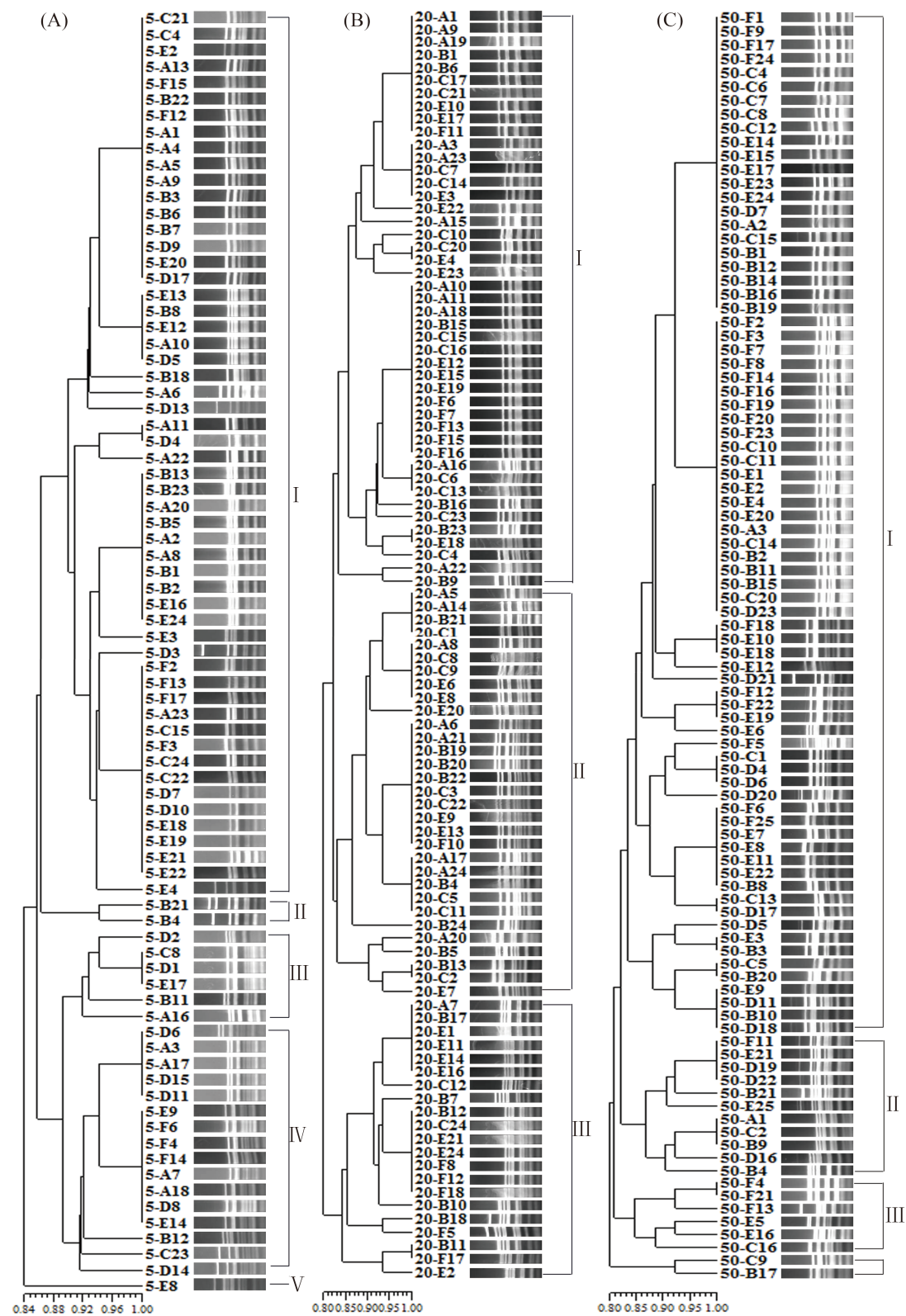


图 2. 石油污染土壤细菌16S rRNA基因Hae III 酶切图谱RFLP聚类分析图

Figure 2. UPGMA dendrogram generated by 16S rRNA gene RFLP fingerprinting. A: 5 cm; B: 20 cm; C: 50 cm.

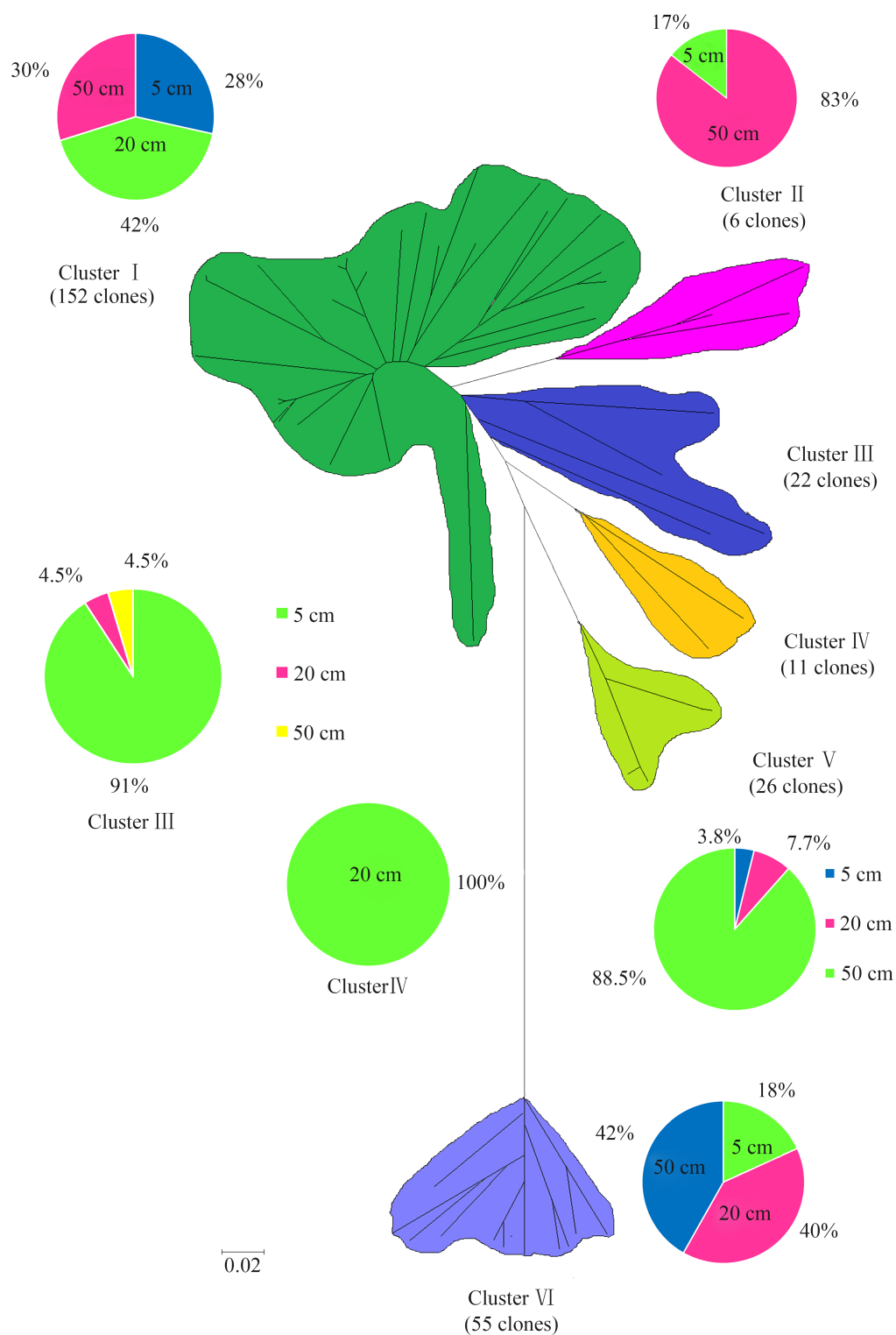


图 3. 土壤细菌16S rRNA基因综合聚类分析图

Figure 3. Dendrogram generated from 16S rRNA gene RFLP fingerprints of all the three samples by UPGMA method. Fingerprints of all the three samples by UPGMA method. Pie charts show the composition of cluster I, cluster II, cluster III, cluster IV, cluster V and cluster VI by clones from different samples.

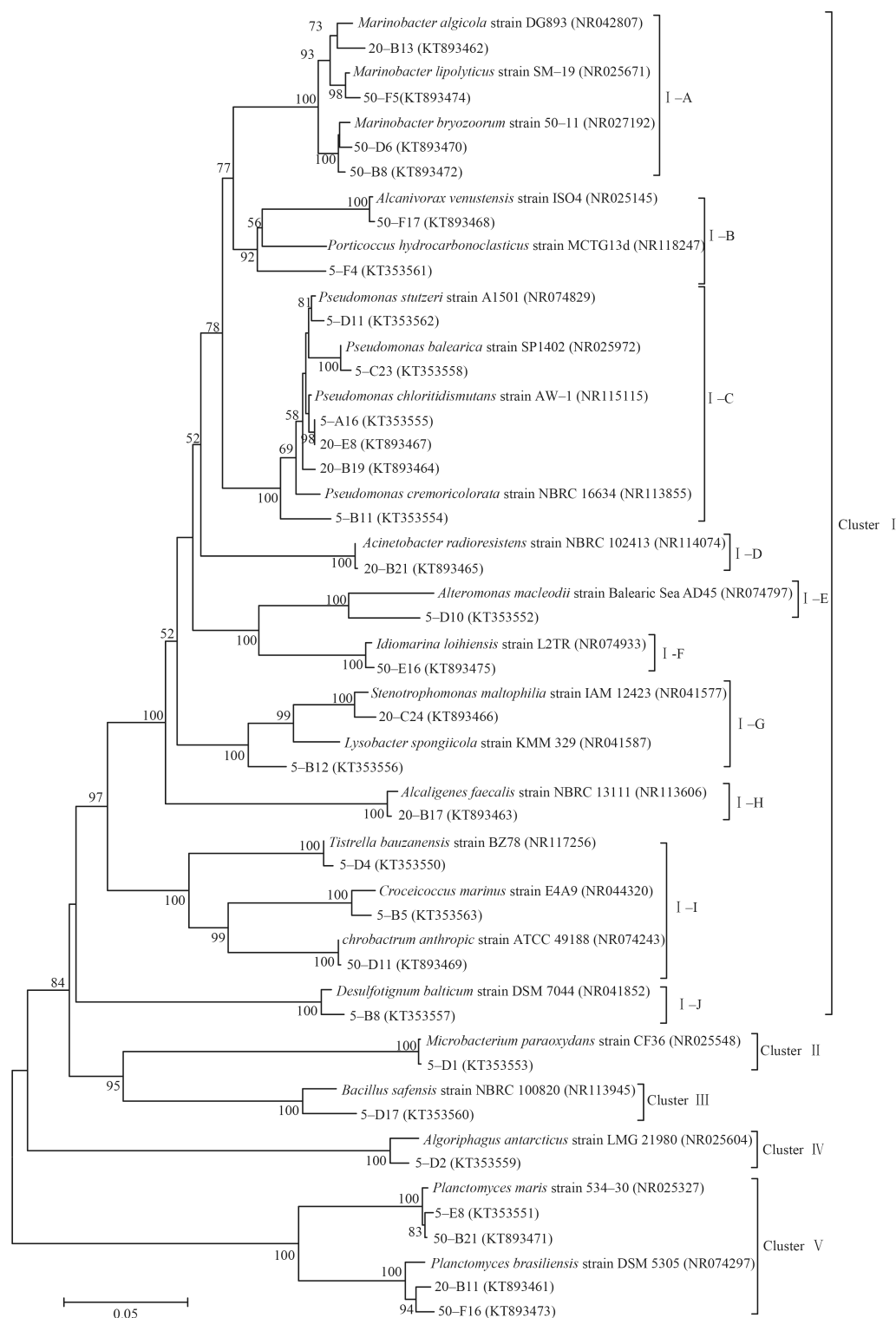


图 4. 石油污染土壤微生物16S rRNA系统发育树

Figure 4. Phylogenetic tree based on bacterial 16S rRNA gene clone libraries from petroleum contaminated soils. Bootstrap values ($n=1000$) greater than 50% are indicated at nodes. Kimura-5 distances were derived from a distance matrix to construct an optimal unrooted tree using the Neighbour-Joining method. Numbers in parentheses are the accession numbers of the sequences used.

有4个OTUs, 该群为浮霉状菌门(Planctomycetes)。

基于16S rRNA序列的系统发育与上述的RFLP分析结果在整体上相对应。其中系统发育法的群 I 和RFLP聚类分析法的群 I 相对应, 其它的小群分类结果也基本对应。由于16S rRNA序列的测定基于RFLP分型的基础, 挑选具有代表性的酶切图谱对应的克隆进行测序, 所以两种分析结果在较低水平的聚类中存在一定的差异。这主要是由于

RFLP是对菌群进行粗略和初步分析。虽然两种方法在一定程度上都反映了石油污染土壤细菌群落的多样性, 但是基于16S rRNA序列系统发育提供了更准确和丰富的信息。本实验2种方法分析结果的差异进一步说明石油污染土壤细菌群落结构多样性。

2.4 石油污染土壤细菌多样性

基于16S rRNA基因的3层石油污染土壤细菌

表2. 基于16S rRNA基因的石油污染土壤细菌多样性及丰富度指数
Table 2. The diversity index of soil microbial community

Sample	Clone	OTU	1/Simpson	Shannon (H)	McIntosh's (U)	Dominance (D)	Evenness (E)
5 cm	80	24	9.753	2.56	26.981	0.746	0.833
20 cm	97	34	17.908	3.07	24.839	0.828	0.898
50 cm	95	29	8.738	2.66	33.422	0.722	0.796

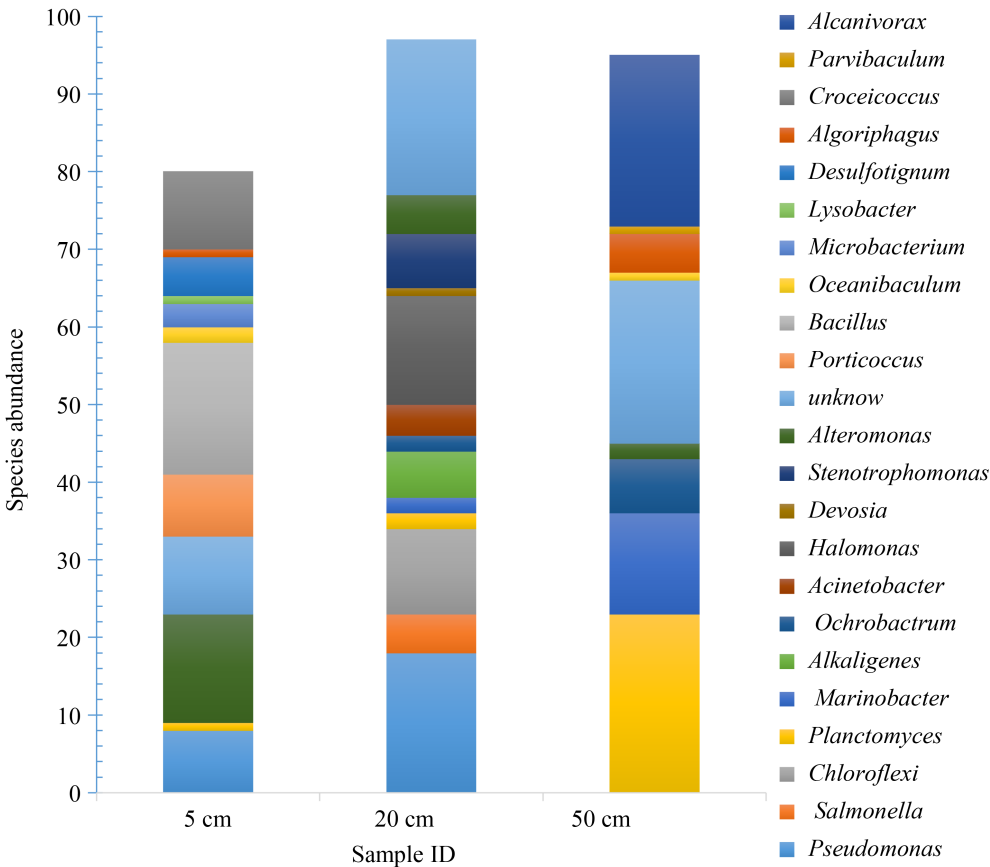


图 5. 石油污染土壤细菌分布图(分类水平按属)

Figure 5. The bacterial community composition in three layer soil samples.

多样性及丰富度指数见表2。由表2可知, 源于20 cm样品除了McIntosh's (U)最低外, 其余指数均高于其它采样点。表明20 cm石油污染土层细菌的物种多样性和丰富度在3个土层中最高。50 cm土层多项指数均较低, 表明物种丰富度和多样性在各土层中最低。McIntosh's (U)指数反应的是群体均一度水平, 由表2可知, 50 cm土样的U值最高, 说明该层土壤中细菌群体均一性良好。

基于每个样点中物种的丰度水平, 筛选主要菌群进行菌群分类地位聚类(横向聚类)及样本聚类(纵向聚类), 利用不同颜色表示样点中主要菌群的相对丰度水平(图5)。结果表明, 在3个采样点中细菌群落结构各不相同, 差异性比较大。比较各个采样点菌群结构在5 cm采样点假单胞菌属(*Pseudomonas*)、交替单胞菌属(*Alteromonas*)、*Porticoccus*属、芽孢杆菌属(*Bacillus*)菌群明显较高。进入20 cm采样点后假单胞菌属(*Pseudomonas*)、

*Chloroflexi*属、产碱杆菌属(*Alkaligenes*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)菌群丰度较高。50 cm采样点浮霉状菌属(*Planctomyces*)、海杆菌属(*Marinobacter*)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)、食烷菌属(*Alcanivorax*)菌群丰度较高。由图5可知, 20 cm采样点细菌种类较多, 其次是5 cm采样点, 相反50 cm采样点细菌种类最少。相较于表层和中层采样点, 下层采样点细菌分布较均匀。

2.5 石油污染土壤细菌群落结构与环境因子之间的关系

通过去趋势对应分析(DCA)可知, 第一排序轴的梯度范围大于3 (lengths of gradient=3.191)^[14], 则环境因子对细菌群落分布的影响较适合用CCA进行评估。用CCA分析石油污染土壤环境因子与细菌群落之间的关系(图6), 结果表明假单胞菌属(*Pseudomonas*)的丰度与TOC和TOC/TN呈正

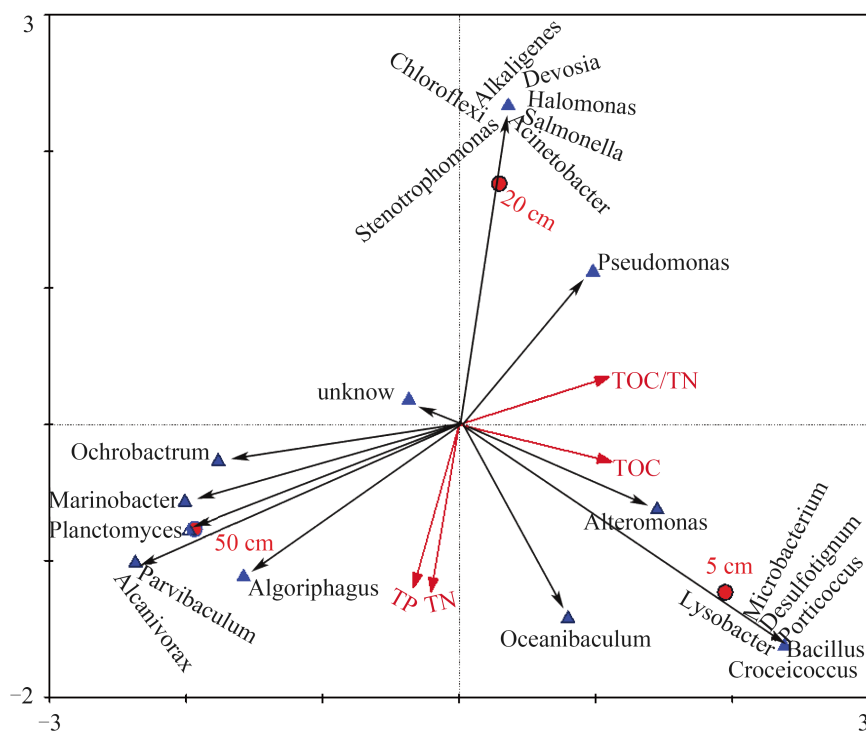


图 6. 环境因子与细菌群落之间CCA分析图

Figure 6. CCA analysis shown the relationship between bacterial community and environmental factors in the petroleum contaminated soils.

相关, 而与TN和TP显著负相关。交替单胞菌属(*Alteromonas*)、*Oceanibaculum*属、微杆菌属(*Microbacterium*)、*Desulfotignum*属、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、*Croceicoccus*属、*Porticoccus*属、溶杆菌属(*Lysobacter*) 8个菌属丰度与TOC呈显著正相关, 这些菌属主要集中分布于5 cm土层。苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)、海杆菌属(*Marinobacter*)、浮霉状菌属(*Planctomyces*)、*Algoriphagus*属、*Parvibaculum*属、食烷菌属(*Alcanivorax*) 6个属的丰度与TN和TP呈正相关, 与TOC/TN呈负相关, 该群体主要分布于50 cm土层。产碱杆菌属(*Alkaligenes*)、*Devosia*属、盐单胞菌属(*Halomonas*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、*Chloroflexi*属、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*) 7个菌属与TN和TP呈显著负相关, 该群体主要集中分布于20 cm土层。

3 讨论

石油污染土壤细菌群落结构与环境条件具有密切相关性, 本研究所有供试土壤中20 cm土层生物多样性指数Shannon (*H*)、Dominance (*D*)、Evenness (*E*)均最高, 所对应的TP、TN均最低(表1)。相反表层土壤受石油污染比较严重TP、TN含量较高, TOC含量最高。由于表层土壤和中层土壤为沙质土壤, 50 cm土壤质地接近种植土壤, 所以其TP、TN含量要高于沙土。50 cm土壤受石油污染较少, 有机质含量很低, 其微生物多样性最低。

16S rRNA序列构建系统发育表明, 亚群 I -A 为海杆菌属(*Marinobacter*), 主要分布于中层和下层土壤, 表层土壤中未检出。亚群 I -B 为 *Alcanivorax venustensis* 属、*Porticoccus hydrocarbonoclasticus* 属, 分别来自于表层和下层土壤; 亚群 I -C 为 *Pseudomonas* 属, 其中69.23%来自于中层土壤, *Pseudomonas* 属主要集中分布在TOC含量高的表层

和中层土壤, 相反在受石油污染轻的50 cm土壤中未检测出。亚群 I -D 和 I -H 分别为 *Acinetobacter radioresistens* 属和 *Alcaligenes saecalis* 属, 都分布在中层土壤; 由此可得出各土层中微生物群落结构存在差异。另一方面, 供试菌株的16S rRNA序列表明, 石油污染土壤细菌与海洋深水环境^[16-17]、火山沉积物^[21]、芳香烃降解菌^[18]以及土壤环境细菌^[23]在系统发育拓扑结构上相似度较高。其中主要和地中海的食烷菌属(*Alcanivorax*)、印度洋的海杆菌属(*Marinobacter*)、阿里海的交替单胞菌属(*Alteromonas*)具有98%–99%的相似性; 与夏威夷罗希海底火山沉积物中 *Idiomarina* 属参比序列具有99%的相似性^[21]; 与芳香烃降解菌的相似性为98%; 与土壤环境细菌相似性为97%–99%。

石油污染土壤细菌群落结构与环境因子之间的关系CCA分析结果表明, 假单胞菌属(*Pseudomonas*)的丰度与TOC呈正相关, 基于每个样点中物种的丰度水平结果表明该菌属主要分布于TOC含量较高的土层, 两种分析结果一致。不同采样点的细菌组成差异比较明显, 其中假单胞菌属(*Pseudomonas*)、交替单胞菌属(*Alteromonas*)、*Porticoccus*属、芽孢杆菌属(*Bacillus*)主要分布于表层土壤; 20 cm土层中假单胞菌属(*Pseudomonas*)、*Chloroflexi*属、产碱杆菌属(*Alkaligenes*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)丰度较高; 50 cm采样点浮霉状菌属(*Planctomyces*)、海杆菌属(*Marinobacter*)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)、食烷菌属(*Alcanivorax*)所占比例较高。

本研究分别运用RFLP分型和系统发育分析石油污染土壤不同深度土层之间细菌多样性以及群落结构, RFLP主要基于3个文库中任意挑选的克隆子酶切图谱的差异性, 在很大程度上具有局限性; 另一方面, 该分析技术是比较粗略的聚类分析方法, 其结果没有16S rRNA序列系统发育分析可靠。但是由于各种原因的限制, 16S rRNA基因

序列的测定, 只选取了具有代表性意义的克隆序列进行测定分析。石油污染土壤是一个很复杂的生境, 高纯度16S rRNA序列的获得相较于直接培养法困难, 基因序列中容易产生嵌合体。本实验在16S rRNA序列的获得过程中, 发现很多测序结果中含有嵌合体, 这也是本实验研究的不足之处。

综上所述, 克拉玛依油田石油污染土壤细菌具有丰富的多样性, 主要属于变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicute)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、浮霉状菌门(Planctomycetes)。环境因子是影响石油污染土壤中细菌多样性和群落分布的重要因素。

参考文献

- [1] Zhang H, Han YT, Zhang SJ, Ding Z, Zhang XX. Optimization for petroleum-contaminated soil remediated by immobilized microorganisms using response surface method. *Acta Petrolei Sinica (Petroleum Processing Section)*, 2015, 31(4): 1028–1034. (in Chinese)
张涵, 韩雨彤, 张守娟, 丁铮, 张秀霞. 响应曲面优化固定化微生物修复石油污染土壤. 石油学报(石油加工), 2015, 31(4): 1028–1034.
- [2] Wang JC, Jin MB, Xiao ZX, Liu LX, Wang FQ, Zhang XB, Zhou TL. Relationship between microbial-composition of petroleum-contaminated soil and its environmental factors in Longdong region of loess plateau. *Bulletin of soil and Water Conservation*, 2012, 32(5): 145–151. (in Chinese)
王金成, 井明博, 肖朝霞, 刘灵霞, 王凤琴, 张希彪, 周天林. 陇东黄土高原地区石油污染土壤微生物群落及其与环境因子的关系. 水土保持通报, 2012, 32(5): 145–151.
- [3] Sood N, Lal B. Isolation of a novel yeast strain *Candida digboiensis* TERI ASN6 capable of degrading petroleum hydrocarbons in acidic conditions. *Journal of Environmental Management*, 2009, 90(5): 1728–1736.
- [4] Hong Q, Dong XJ, He LJ, Jiang X, Li SP. Isolation of a biphenyl-degrading bacterium, *Achromobacter* sp. BP3, and cloning of the *bph* gene cluster. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2009, 63(4): 365–370.
- [5] Liu MM, Jin LH, Li WS, Jia YY. Study on immobilization of an oil-degrading strain on activated carbon fiber. *Environmental Pollution and Control*, 2009, 31(10): 48–51. (in Chinese)
刘媚媚, 金腊华, 李文松, 贾雅漪. 一株石油降解菌的活性炭纤维固定化研究. 环境污染与防治, 2009, 31(10): 48–51.
- [6] Yin DD, Chao QF, Wang LX, Wei CY, Yang BY, Chen ZD, Yao XY. Selective activation condition of stratal microflora in Karamay oil field. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2015, 52(1): 102–108. (in Chinese)
尹丹丹, 晁群芳, 王立新, 韦超英, 杨滨银, 陈志丹, 姚小云. 克拉玛依油田内源微生物选择性激活条件研究. 新疆农业科学, 2015, 52(1): 102–108.
- [7] Wang XH, Chao QF, Xu X, Li L. Study on the isolation and identification of petroleum-degrading strains and its ratio optimization. *Industrial Safety and Environmental Protection*, 2013, 39(2): 42–46. (in Chinese)
王旭辉, 晁群芳, 徐鑫, 李磊. 高效石油降解菌的筛选、鉴定及其配比优化的研究. 工业安全与环保, 2013, 39(2): 42–46.
- [8] Chen ZD, Chao QF, Yang BY, Yao XY, Yin DD. Optimizing degradation conditions of bacteria B2 a pyrene degradation and its degrading gene. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2012, 6(10): 3795–3800. (in Chinese)
陈志丹, 晁群芳, 杨滨银, 姚小云, 尹丹丹. 一株芘降解菌B2的降解条件优化及降解基因. 环境工程学报, 2012, 6(10): 3795–3800.
- [9] Yang BY, Chao QF, Chen ZD, Yao XY, Yin DD. Isolation of a phenanthrene-degrading bacteria and phenanthrene biodegradation kinetics. *Environmental pollution and control*, 2013, 35(4): 62–66. (in Chinese)
杨滨银, 晁群芳, 陈志丹, 姚小云, 尹丹丹. 一株菲降解菌的筛选及降解动力学分析. 环境污染与防治, 2013, 35(4): 62–66.
- [10] Cao XN. Bacterial diversity of Karamay oil leakage and contaminated areas. Shihezi: Master Dissertation of A Dissertation Submitted to Shihezi University, 2012. (in Chinese)
曹小妮. 克拉玛依渗油与采油污染区细菌多样性研究. 石河子: 石河子大学硕士学位论文, 2012.
- [11] 鲍士旦. 土壤农化分析. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- [12] Zhang JJ, Nie B, Yang JK. Community composition and screening of cellulase-producing bacteria in a papermaking wastewater oxidation pond. *Microbiology China*, 2014, 41(10): 1985–1993. (in Chinese)
张静静, 聂犇, 杨江科. 造纸废液氧化塘纤维素酶产生菌群的分析与产酶菌株的筛选. 微生物学通报, 2014, 41(10): 1985–1993.

- 1985–1993.
- [13] Yang JK, Cheng ZB, Li J, Miao LH. Community composition of NirS-type denitrifier in a shallow eutrophic lake. *Microbial Ecology*, 2013, 66(4): 796–805.
- [14] Song HN, Du BH, Zhang MY, Fu WZ, Lu XM, Li ZH, Ding YQ. Effect of environmental factors on bacterial community in Lake Dongping sediment. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(8): 1065–1071. (in Chinese)
宋洪宁, 杜秉海, 张明岩, 付伟章, 路晓萌, 李正华, 丁延芹. 环境因素对东平湖沉积物细菌群落结构的影响. *微生物学报*, 2010, 50(8): 1065–1071.
- [15] Bonis BM, Gralnick JA. *Marinobacter subterranei*, a genetically tractable neutrophilic Fe (II)-oxidizing strain isolated from the Soudan Iron Mine. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 719–729.
- [16] Yuan J, Lai QL, Sun FQ, Zheng TL, Shao ZZ. The diversity of PAH-degrading bacteria in a deep-sea water column above the Southwest Indian Ridge. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 853–864.
- [17] Fernández-Martínez J, Pujalte MJ, García-Martínez J, Mata M, Garay E, Rodríguez-Valera F. Description of *Alcanivorax venustensis* sp. nov. and reclassification of *Fundibacter jadensis* DSM 12178T (Bruns and Berthe-Corti 1999) as *Alcanivorax jadensis* comb. nov., members of the emended genus *Alcanivorax*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53(1): 331–338.
- [18] Gutierrez T, Nichols PD, Whitman WB, Aitken MD. *Porticoccus hydrocarbonoclasticus* sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium identified in laboratory cultures of marine phytoplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(3): 628–637.
- [19] Yan YL, Yang J, Dou YT, Chen M, Ping SZ, Peng JP, Lu W, Zhang W, Yao ZY, Li HQ, Liu W, He S, Geng LZ, Zhang XB, Yang F, Yu HY, Zhan YH, Li DH, Lin ZL, Wang YP, Elmerich C, Lin M, Jin Q. Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(21): 7564–7569.
- [20] Feng GD, Yang SZ, Wang YH, Yao Q, Zhu HH. *Acinetobacter refrigeratorensis* sp. nov., isolated from a domestic refrigerator. *Current Microbiology*, 2014, 69(6): 888–893.
- [21] Hou SB, Saw JH, Shan K, Freitas TA, Belisle C, Kawarabayasi Y, Donachie SP, Pikina A, Galperin MY, Koonin EV, Makarova KS, Omelchenko MV, Sorokin A, Wolf YI, Li QX, Soo Y, Campbell S, Denery J, Aizawa SI, Shibata S, Malahoff A, Alam M. Genome sequence of the deep-sea γ -proteobacterium *Idiomarina loihiensis* reveals amino acid fermentation as a source of carbon and energy. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2004, 101(52): 18036–18041.
- [22] Romanenko LA, Uchino M, Tanaka N, Frolova GM, Mikhailov VV. *Lysobacter spongiicola* sp. nov., isolated from a deep-sea sponge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(2): 370–374.
- [23] Zhang DC, Liu HC, Zhou YG, Schinner F, Margesin R. *Tistrella bauzanensis* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(9): 2227–2230.
- [24] Xu XW, Wu YH, Wang CS, Wang XG, Oren A, Wu M. *Croceicoccus marinus* gen. nov., sp. nov., a yellow-pigmented bacterium from deep-sea sediment, and emended description of the family *Erythrobacteraceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(9): 2247–2253.
- [25] Chain PSG, Lang DM, Commerci DJ, Malfatti SA, Vergez LM, Shin M, Ugalde RA, Garcia E, Tolmasky ME. Genome of *Ochrobactrum Anthropi* ATCC 49188^T, a versatile opportunistic pathogen and symbiont of several eukaryotic hosts. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(16): 4274–4275.
- [26] Friedrich MW. Phylogenetic analysis reveals multiple lateral transfers of adenosine-5'-phosphosulfate reductase genes among sulfate-reducing microorganisms. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(1): 278–289.
- [27] Van Trappen S, Vandecandelaere I, Mergaert J, Swings J. *Algoriphagus antarcticus* sp. nov., a novel psychrophile from microbial mats in Antarctic lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(6): 1969–1973.

Effect of environmental factors on bacterial community structure in petroleum contaminated soil of Karamay oil field

Jianfang Liang¹, Jiangke Yang², Yang Yang¹, Qunfang Chao^{1*}, Yalan Yin¹, Yaguang Zhao¹

¹ College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

² School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, Hubei Province, China

Abstract: [Objective] This study aimed to study the phylogenetic diversity and community structure of bacteria in petroleum contaminated soils from Karamay oil field, and to analyze the relationship between the community variation and the environment parameters, to provide a reference for bioremediation of petroleum contaminated soils. [Methods] We collected samples from petroleum contaminated soils in 5 cm, 20 cm and 50 cm depth layers, and measured the environment parameters subsequently. We constructed three 16S rRNA gene clone libraries of these soil samples, and then determined the operation taxonomy units (OTUs) restriction fragment length polymorphism method, and finally sequenced the representative clones of every OUT. The diversity, richness and evenness index of the bacteria communities were calculated by using Biodap software. Neighbor-Joining phylogenetic tree was constructed based on 16S rRNA gene sequences of bacteria from Karamay oil field and the references from related environments. Canomial correspondence analysis (CCA) was used to analyze the relationship between environment parameters and species by using CANOCO 4.5 software. [Results] Environment parameters showed that 50 cm deep soil contained the highest amount of total nitrogen (TN) and total phosphorus (TP), whereas the 20 cm depth soil contained the lowest amount. The 5 cm depth soil contained the highest amount of total organic carbon (TOC), whereas the 50 cm depth soil contained the lowest amount. Among the 3 layers, 20 cm depth had the highest diversity and richness of bacteria, whereas the bacteria in 50 cm depth was the lowest. Phylogenic analyses suggested that the bacteria in Karamay oil field could be distributed into five groups at the level of phylum, Cluster I to V, respectively belong to Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicute, Bacteroidetes, Planctomycetes. Cluster I accounts for 78.57% of all tested communities. CCA results showed that TN, TP, TOC significantly affected the bacteria community structure. Especially, TOC content is significantly related to the distribution of *Pseudomonas*. [Conclusion] The petroleum-contaminated soil inhabited abundant of bacteria. The diversity index and spatial distribution of these communities were affected by the environment parameters in the soil.

Keywords: petroleum contaminated soil, restriction fragment length polymorphisms (RFLP), bacterial diversity, phylogeny, canomial correspondence analysis

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31460027)

*Corresponding author. E-mail: xjchqf@sina.com

Received: 8 November 2015; Revised: 11 January 2016; Published online: 22 January 2016